



EndoFree Mini Plasmid Kit II

无内毒素质粒小提中量试剂盒

版本号：V1.1-202206

一、产品规格

组分编号	产品组成	BLGE060 (50T)	BLGE060 (5T)
BLGE299-30ML	平衡液 BL (Buffer BL)	30 mL	3 mL
BLGE300-30ML	溶液 P1 (Buffer P1)	30 mL	3 mL
BLGE301-30ML	溶液 P2 (Buffer P2)	30 mL	3 mL
BLGE302-30ML	溶液 P4 (Buffer P4)	30 mL	3 mL
BLGE309-30ML	去蛋白液 PD (Buffer PD)	30 mL	3 mL
BLGE303-15ML	漂洗液 PW (Buffer PW)	15 mL	1.5 mL
BLGE304-15ML	洗脱缓冲液 TB (Buffer TB)	15 mL	1.5 mL
BLGE305-300μl	RNaseA (10 mg/mL)	300 μL	30 μL
BLGE311-50pcs	过滤柱 CS (Filtration Columns CS)	50 个	5 个
BLGE307-50pcs	吸附柱 CP4 (Spin Columns CP4)	50 个	5 个
BLGE308-100pcs	收集管(2 mL) (Collection Tubes 2 mL)	50 个× 2	10 个

二、产品情况

本试剂盒采用了可高效专一结合质粒 DNA 的硅胶膜吸附技术。同时采用特殊的溶液 P4 和过滤柱 CS，可有效的去除内毒素、蛋白等杂质；整个提取过程仅需 1 个小时，方便快捷。

推荐过夜培养的大肠杆菌菌液使用量为 5 - 15 mL 每次，高拷贝质粒得率一般在 15 - 70 μg 左右；低拷贝质粒得率一般在 100 - 300 μg 左右。质粒的提取得率和质量与宿主菌的种类、培养条件、菌体裂解、质粒拷贝数、质粒稳定性、抗生素等因素有关。

使用本试剂盒提取的质粒 DNA 可适用于转染多种细胞及各种常规操作，包括酶切、PCR、测序、连接等实验。

三、储存运输

常温运输；

试剂盒在 15 - 25℃干燥室温条件下，可保存 12 个月；

试剂盒在 2 - 8℃条件下可保存更长时间；

单独包装的 RNaseA 在室温可稳定保存 12 个月以上；

溶液 P1 加入 RNaseA 后，在 2 - 8℃条件下可稳定保存 6 个月。

四、注意事项

在使用本试剂盒之前请务必阅读此注意事项！



- (一) 当试剂盒在 2 - 8℃低温贮存时, 使用前应先将试剂盒内的溶液在室温中放置一段时间, 必要时可在 37℃水浴中预热 10 min, 以平衡溶液温度;
- (二) 溶液 P1 在使用前先加入全部的 RNase A 并混匀, 放入 2 - 8℃保存;
- (三) 第一次使用前应按照瓶签说明, 先在漂洗液 PW 中加入无水乙醇;
- (四) 使用前先检查平衡液 BL、溶液 P2 和 P4 是否出现结晶或者沉淀, 如有结晶或者沉淀, 可在 37℃水浴中加热几分钟以使其恢复澄清;
- (五) 实验前使用平衡液 BL 处理吸附柱, 可以最大限度激活硅基质膜, 提高得率; 但用平衡液处理过的柱子最好立即使用, 放置时间过长会影响使用效果;
- (六) 注意不要直接接触溶液 P2 和 P4, 使用后应立即盖紧盖子;
- (七) 提取的质粒量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关; 如果所提质粒为低拷贝质粒或大于 10 kb 的大质粒, 应加大菌体使用量, 同时按比例增加 P1、P2、P4 的用量, 洗脱缓冲液应在 65 - 70℃预热, 可以适当的延长吸附和洗脱的时间, 以增加提取效率;
- (八) 所有离心步骤均为使用台式离心机室温下进行离心, 速度为 12,000 rpm (~13,400 × g)。

五、实验流程

注意:

第一次使用前应按照瓶签的说明先在溶液 P1 中加入全部的 RNase A;

第一次使用前应按照瓶签的说明先在漂洗液 PW 中加入无水乙醇。

(一) 步骤 1

加 500 μL 的平衡液 BL 至吸附柱 CP4 中(吸附柱放入收集管中), 12,000 rpm (~13,400 × g) 离心 1 min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

注意: 用平衡液处理过的柱子最好立即使用, 放置时间过长会影响使用效果。

(二) 步骤 2

取 5 - 15 mL 过夜培养的菌液加入离心管中, 12,000 rpm (~13,400 × g) 离心 1 min, 尽量吸除上清。

注意: 可以通过多次离心的方法将较多菌液的菌体沉淀收集到一个离心管中, 菌体量以保证充分裂解为宜, 避免过多的菌体导致的裂解不充分, 从而降低质粒的提取效率。

(三) 步骤 3

加 500 μL 溶液 P1 至离心管中(请检查是否已加入 RNaseA), 使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌沉淀。

注意: 充分悬浮细菌沉淀, 如果有未混匀的菌块, 会影响裂解, 导致质粒提取量和纯度偏低。

(四) 步骤 4

加 500 μL 溶液 P2 至离心管中, 温和地上下翻转 6 - 8 次使菌体充分裂解。

注意: 务必温和混合, 以免发生基因组 DNA 污染。混合后菌液应变得清亮粘稠, 裂解



时间控制在 5 min 内，以免质粒受到破坏。如果未变清亮，可能由于菌体过多，导致裂解不彻底，应减少菌体量。

(五) 步骤 5

加 500 μ L 溶液 P4 至离心管中，立即温和地上下翻转 6 - 8 次，充分混匀，此时会出现白色絮状沉淀，然后室温放置 10 min 左右，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 10 min，此时沉淀在离心管底部聚集；如果上清中还有微小白色沉淀，可再次离心后收取上清。

注意：P4 加入后应立即混合，避免产生局部沉淀。

(六) 步骤 6

将步骤 5 收集的上清液分次加入过滤柱 CS (**过滤柱放入收集管中**)，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 2 min，自备干净的 2 mL 离心管，收集滤液。

(七) 步骤 7

加 0.3 倍滤液体积的异丙醇至滤液中，上下颠倒混匀后转移到吸附柱 CP4 中 (**吸附柱放入收集管中**)，室温 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

注意：过滤后滤液会损失，根据损失的不同请加入不同体积的异丙醇，加入异丙醇过多容易导致 RNA 污染。吸附柱 CP4 的最大容积为 700 μ L，所以需要分次过柱。

(八) 步骤 8

加 500 μ L 去蛋白液 PD 至吸附柱 CP4 中，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CP4 放入收集管中。

(九) 步骤 9

加 600 μ L 漂洗液 PW 至吸附柱 CP4 中 (**请先检查是否已加入无水乙醇**)，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CP4 放入收集管中。

注意：加入漂洗液 PW 后室温静置 2 - 5 min，有助于更好地溶解去除杂质。

(十) 步骤 10

重复步骤 9 一次。

(十一) 步骤 11

将吸附柱 CP4 重新放回收集管中，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 2 min，去除吸附柱中残余的漂洗液。

注意：漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR 等）实验。建议将吸附柱 CP4 开盖，置于室温放置数分钟，彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液，以确保下游实验不受残留乙醇的影响。

(十二) 步骤 12

悬空滴加 100 - 300 μ L 洗脱缓冲液 TB 至吸附膜的中间部位 (**吸附柱 CP4 置于一个干净的离心管中**)，室温放置 2 min，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 1 min 将质粒溶液收集到离心管中。



注意：可将得到的溶液重新加入到吸附柱中，重复步骤 12，以增加质粒的回收效率。

洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若用 ddH₂O 做洗脱液应保证其 pH 值 7.5 - 8.0 范围内，pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率。洗脱缓冲液用量不应少于 100 μ L，体积过小影响回收效率。且 DNA 产物应保存在 -20℃，以防 DNA 降解。

六、质量检测

- （一）可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测得到的质粒浓度与纯度。OD₂₆₀ 值为 1 相当于大约 50 μ g/mL 双链 DNA。纯化的质粒 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 通常在 1.7 - 1.9 左右，可直接应用于细胞转染甚至动物体内实验等对质粒纯度要求很高的实验中。
- （二）如果洗脱时使用 ddH₂O 而不使用洗脱缓冲液，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值会偏低，但并不表示纯度低，因为 pH 值和离子的存在会影响光吸收值。

本产品仅供科研使用，不得用于临床诊断！